

PARENT COOPERATION TREATY

BEST AVAILABLE COPY

PCT

**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year)
06 décembre 2001 (06.12.01)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HIRAKI, Yusuke
Toranomon No. 5 Mori Building 3th
floor
17-1, Toranomon 1-chome
Minato-ku, Tokyo 105-0001
JAPON

Applicant's or agent's file reference
PH-911-PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/JP00/02112

International filing date (day/month/year)
31 mars 2000 (31.03.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

the applicant the inventor the agent the common representative

Name and Address

JAPAN as represented by SECRETARY
OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE
AND TECHNOLOGY
3-1, Kasumigaseki 1-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-8921
Japan

State of Nationality JP	State of Residence JP
----------------------------	--------------------------

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

the person the name the address the nationality the residence

Name and Address

NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCES
INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY
3-1, Kasumigaseki 1-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100-8921
Japan

State of Nationality JP	State of Residence JP
----------------------------	--------------------------

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

 the receiving Office the designated Offices concerned the International Searching Authority the elected Offices concerned the International Preliminary Examining Authority other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Susumu KUBO

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

004517857

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PARTNERSHIP COOPERATION TREATY
BEST AVAILABLE COPY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT**NOTIFICATION OF ELECTION**
(PCT Rule 61.2)

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 05 February 2001 (05.02.01)	To:
International application No. PCT/JP00/02112	Applicant's or agent's file reference PH-911-PCT
International filing date (day/month/year) 31 March 2000 (31.03.00)	Priority date (day/month/year) 29 June 1999 (29.06.99)
Applicant IWAKURA, Masahiro	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

22 December 2000 (22.12.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Kiwa Mpay Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年1月4日 (04.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/00797 A1

(51) 国際特許分類⁷:
9/24, 15/52, 15/53, 15/56

C12N 9/00, 9/02,

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 堀倉正寛
(IWAKURA, Masahiro) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市松代5-552-2 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/02112

(22) 国際出願日: 2000年3月31日 (31.03.2000)

(74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) ; 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒルズ5階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): JP, US.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(30) 優先権データ:
特願平11/183664 1999年6月29日 (29.06.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 工業技術院長が代表する日本国 (JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: SULFUR ATOM-FREE ENZYME PROTEINS

(54) 発明の名称: 硫黄原子を含まない酵素蛋白質

(57) Abstract: Sulfur atom-free enzyme proteins sustaining the activity of the intact enzyme proteins and showing an oxidation resistance wherein L-cysteine and L-methionine residues in enzyme proteins have been substituted by 18 L-amino acid residues including L-alanine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-phenylalanine, L-glycine, L-histidine, L-isoleucine, L-lysine, L-leucine, L-asparagine, L-proline, L-glutamine, L-arginine, L-serine, L-threonine, L-valine, L-tyrosine and L-tryptophan. Namely, enzyme proteins having an antioxidative property against oxidation with hydrogen peroxide, etc. while sustaining the activity of the intact enzymes and a process for producing the same.

(57) 要約:

本発明は、酵素蛋白質のL-システイン及びL-メチオニン残基をL-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、及びL-トリプトファンの18種類のL-アミノ酸残基に置換した、元の酵素蛋白質の活性を保持し耐酸化性を有する硫黄原子を含まない酵素タンパク質に関する。本発明によれば、野性型酵素の活性を保持するとともに、過酸化水素等の酸化に対する抗酸化特性を有する酵素蛋白質、及びその製造方法が提供される。

WO 01/00797 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

明細書

硫黄原子を含まない酵素蛋白質

技術分野

本発明は、硫黄原子を含まない酵素蛋白質に関する。

背景技術

酵素は、その基質特異性が非常に高いためバイオセンサー等の分析機器開発、バイオリアクターなどのファインケミカル産業、また、特定汚染物質の分解除去など利用が試みられ、また期待されている。

近年の質量分析装置の発達により、蛋白質の質量分析ができるようになってきた。蛋白質の質量数を質量分析により求めると、蛋白質として高度に精製された蛋白質でもアミノ酸配列から予想される質量数以外の質量数を示すものの混在が見いだされる様になってきた。例えば、L-システインを含まないジヒドロ葉酸還元酵素を用いて詳しく調べたところ、質量数変化は、質量数16を単位とするものであり、メチオニンの酸化がその主な原因である。

酵素の利用を考える場合、酸化による蛋白質の変質は大きな障害となる。例えば、多くのバイオセンサーは電極反応を利用するが、その際過酸化水素等の酸化物が電極反応により生成し、これは酵素を酸化しセンサー全体の劣化を早めたり、信頼性を失わせたりする可能性が考えられるからである。また、長期間溶液中で酵素を利用する場合も水溶液中の酸素による酸化を防ぐことは困難もしくはコスト的に問題となるであろう。

蛋白質を構成する原子は、水素(H)、炭素(C)、窒素(N)、酸素(O)、及び硫黄(S)の5種類である。このうち、硫黄原子は他の原子に比べて電子価特性等反応性の強い原子である。

生物が作る蛋白質は、遺伝子であるDNA中にトリプレットコドンで暗号化されているL-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-

アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、L-トリプトファン、L-システイン、及びL-メチオニンの20種類のL-アミノ酸残基から構成される。このうち、含硫アミノ酸は、L-システイン及びL-メチオニンである。

L-システインの硫黄原子は、チオール(-SH)基として存在する。チオール基は非常に反応性が高く、酸素、過酸化水素により容易に酸化されて、ジスルフィドさらにスルフィン酸を生成する。

L-メチオニンの硫黄原子は、チオエーテル(-S-CH₃)基として存在する。チオエーテル基は、チオール基ほど反応性は強くないが、過酸化水素により容易に酸化されてメチオニンスルフォキシドが生成する。

このことは、L-システイン及びL-メチオニン、即ち含硫アミノ酸を含まない酵素は、抗酸化特性を有することを示唆している。

L-システイン及びL-メチオニンに対応するコドンは、TGTとTGC(L-システイン)及びATG(L-メチオニン)の3種類である。一方、硫黄を含まないその他18種のL-アミノ酸に対応するコドンは、58種類である。従って、平均すると蛋白質は、20アミノ酸に1個の割合(3/61)で、L-システインもしくはL-メチオニンを含むことになる。このことは、100アミノ酸以上で構成される蛋白質は、非常に高い確率でL-システインもしくはL-メチオニンを含んでいることを意味する。実際、これまで報告された蛋白質のうちで触媒機能を有する酵素を調べてみると、L-システイン及びL-メチオニンを全く含まないものは見あたらない。

即ち、生物が作る酵素は全て含硫アミノ酸を含んでいるのである。

ところが、近年の遺伝子操作を背景とする蛋白質変異の結果は、少なくとも一箇所の変異であれば、元の酵素機能を失わせることなく含硫アミノ酸を他のアミノ酸に置換することが可能であることを明らかにしてきている。ただ、本発明が完成された以前においては、全ての含硫アミノ酸を他のアミノ酸に置換した酵素が元の機能と同等の活性を示すか否かに関しては明らかとなっていた。むしろ、酵素活性の発現には、含硫アミノ酸の存在が必須であるとの考え方方が支配的であった。

のことから、次の相反する 2 つ可能性が考えられる。

第 1 の可能性は、生物がその生命維持に必要とするために必要な非常に高い酵素活性を発現するためには、含硫アミノ酸の存在が必須である。

第 2 の可能性は、非常に高い酵素活性を発現するためには、含硫アミノ酸の存在は必ずしも必要としないが、生命の起源の過程においてたまたま硫黄原子含んだ形で蛋白質を利用し且つ遺伝子のコード形態を確立させたため、生物が作る酵素はコドン使用頻度の割合に対応して含硫アミノ酸を含んでいる。従つて、全ての含硫アミノ酸を他のアミノ酸に置換し、生物が作る含硫アミノ酸を含む酵素と同等の機能を有する酵素を作ることが可能である。

もし、第 2 の可能性が正しければ、生物由来の含硫アミノ酸を含む酵素の全ての含硫アミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより、抗酸化特性を有する酵素を製造する一般的な方法を開発できることになる。

発明の開示

本発明者らは、銳意研究を重ね、生物由来の含硫アミノ酸を含む酵素の全ての含硫アミノ酸を他のアミノ酸に置換しても、元の酵素と同程度もしくはそれ以上の酵素活性を示す酵素が製造できることを実証するとともに、生物由来の野性型酵素から含硫アミノ酸を含まない酵素への変異戦略を確立し、本発明を完成させるに至った。

なお、本発明における野性型酵素とは、生物由来の酵素の他に、生物由来の酵素に人工的に変異させて得られた酵素を含むものとする。

すなわち、本発明は、野性型酵素の活性を保持するとともに、過酸化水素等の酸化に対する抗酸化特性を有する酵素蛋白質、及びその製造方法を提供することを目的とするものである。

本発明では、上記目的を達成するために、次のような構成を採る。

1. L-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、及びL-トリプトファンの 18 種類の L-アミノ酸残

基から構成される硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

2. L-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、L-トリプトファン、L-システイン、及びL-メチオニンの20種類のL-アミノ酸残基から構成される酵素蛋白質のL-システイン及びL-メチオニン残基をL-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、及びL-トリプトファンの18種類のL-アミノ酸残基に置換した、元の酵素蛋白質の活性を保持し耐酸化性を有する上記1.の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

3. アミノ酸置換が合成DNAを使用した部位特異的変異法により行われたものである上記2.の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

4. 酵素活性が酸化還元活性、もしくは加水分解活性の機能を有することを特徴とする上記1.～3.いずれかの硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

5. ジヒドロ葉酸還元酵素活性を保持し耐酸化性を有することを特徴とする上記1.～4.いずれかの硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

6. キシラナーゼの活性を保持し耐酸化性を有することを特徴とする上記1.～4.いずれかの硫黄原子を含まない酵素蛋白質。

7. 次の工程からなる組み合わせ変異による硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

(1) 硫黄原子を含むアミノ酸(含硫アミノ酸)の配列上の位置がA_i(i=1～n)である、n個の含硫アミノ酸を含む全長m個のアミノ酸よりなる酵素蛋白質をコードするDNA配列のL-メチオニンをコードする開始コドンを、L-メチオニン-L-アラニン、L-メチオニン-L-セリン又はL-メチオニン-L-プロリンのコドンで置換した変異体遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、最も活性が高いものを選び得られる置換変異体をA1/M1とする；

(2) その他の部位の A_i ($i = 2 \sim n$) の含硫アミノ酸をコードするコドンを 1. に記載される 18 種類の他のアミノ酸（以下、当該アミノ酸を「含硫アミノ酸以外の他のアミノ酸」という）をコードするコドンで置換した変異遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、酵素活性を示す p 個の変異体酵素蛋白質を選び得られる置換変異体を $A_i / B_{i,j}$ ($j = 1 \sim p$) とする；

(3) 置換変異体のうち活性の高いものから最大 3 個の置換変異体 $A_i / B_{i,1}$ 、 $A_i / B_{i,2}$ 及び $A_i / B_{i,3}$ を選択するが、ここで置換変異体は $A_i / B_{i,1} > A_i / B_{i,2} > A_i / B_{i,3} > \dots > A_i / B_{i,p}$ の順に活性が小さくなるものとする；

(4) 全ての部位 A_i ($i = 2 \sim n$) の含硫アミノ酸について、(2)、(3) と同様にして活性を有する置換変異体を選択し、それらの変異体と A_1 / MA_1 の変異体を全て組み合わせた最大 $3 \times (n - 1)$ 個の変異体を作成し、それらの酵素活性を測定して元の酵素蛋白質と同等以上の活性を有する変異体酵素蛋白質を作成する。

8. 次の工程からなる段階的変異による硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

(1) 硫黄原子を含むアミノ酸（含硫アミノ酸）の配列上の位置が A_i ($i = 1 \sim n$) である、 n 個の含硫アミノ酸を含む全長 m 個のアミノ酸よりなる酵素蛋白質をコードする DNA 配列の L-メチオニンをコードする開始コドンを、L-メチオニン- L-アラニン、L-メチオニン- L-セリン又は L-メチオニン- L-プロリンのコドンで置換した変異体遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、最も活性が高いものを選び得られる置換変異体を A_1 / MA_1 とする；

(2) A_1 / MA_1 変異体の A_2 の含硫アミノ酸をコードするコドンを前記「含硫アミノ酸以外の他のアミノ酸」をコードするコドンで置換した変異遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた 2 重変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、活性の高いものから最大 3 個の 3 重変異体を選ぶ；

(3) 得られた 2 重変異体のそれぞれの A_3 の含硫アミノ酸をコードするコド

ンを前記「含硫アミノ酸以外の他のアミノ酸」をコードするコドンで置換した変異遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた3重変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、活性の高いものから最大3個の3重変異体を選ぶ；

(4) 以下同様に、4重、・・・、n重変異体を作成し、最後のn重変異体の酵素活性を調べ、元の酵素の活性と同等以上の活性を有する変異体酵素蛋白質を作成する。

9. 段階的に変異する部位の順番が、A1、A2、・・・、Anの順列組み合わせの種類 ($n!$ 通り) のうちどれか一つであることを特徴とする上記8.の段階的変異による硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

10. 含硫アミノ酸の配列上の位置がAi (i = 1 ~ n) である、n個の含硫アミノ酸を含む全長m個のアミノ酸よりなる酵素蛋白質において、k個の部位に関しては上記7.の方法を行い、残りのn - k個の部位に関しては上記9.の方法を行うことを特徴とする硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

本発明において、元の蛋白質の活性を保持するとは、野性型酵素の10%以上の活性、好ましくは50%以上の活性、特に好ましくは100%以上の活性を有し、元の酵素蛋白質と同様の用途に使用できることを意味する。

次に、本発明において目的とする酵素蛋白質を得る第1の方法の手順について説明する。

全長m個のアミノ酸よりなる野性型酵素において含硫アミノ酸がn個あるとする。その各々のアミノ酸配列上の位置を、Ai (i = 1 ~ n) とする。

蛋白質の開始コドンに由来するアミノ酸は、L-メチオニンである。

アミノ末端のL-メチオニンを含まないようにするために、宿主細胞が有するメチオニルアミノペプチダーゼ(methionyl-aminopeptidase)の反応特異性に従い、メチオニンをアミノ末端から脱離させることができる。

例えば、宿主として大腸菌を用いた場合、アミノ末端をL-メチオニン-L-アラニン、L-メチオニン-L-セリン、もしくはL-メチオニン-L-プロリンのいずれかにすることにより、末端のL-メチオニンが脱離した形で発現させることができる。従って、まず第一に、酵素のアミノ末端の変異として、L-メチオニン-L-アラニン、L-メチオニン-L-セリン、もしくはL-

メチオニン- $\text{L-}\text{プロリン}$ のコドンを有する変異体遺伝子を作製し、これを宿主で発現させ、得られた変異体の活性を測定し、最も活性が高いものを選ぶことにより、アミノ末端がメチオニンでない変異酵素を作製できる。

この様にして得られる変異を、 A 1 / M A 1 と表す。

その他の部位の A i ($i = 2 \sim n$) の含硫アミノ酸に関して、含硫アミノ酸をコードするコドンを前記「含硫アミノ酸以外の他のアミノ酸」(最大 18 種類)をコードするコドンで置換した変異遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた 2 重変異体酵素蛋白質の酵素活性を調べる。

酵素蛋白質中の特定の部位でのアミノ酸置換は、合成DNAを用いた部位特異的変異法により行うことができる。

部位特異的変異法としては、ZollerとSmithらの方法 (Zoller, M. J. and Smith, M. (1983) *Methods in Enzymology*, vol. 100, p. 468) 及びその改良方法、本実施例で用いているPCRを利用した方法などの他多く方法が公知である。本発明においては、目的の含硫アミノ酸部位でのアミノ酸置換できる変異方法であればどのような方法でも適用可能であり、目的を達成することができる。従って、変異体の作製方法によって本発明は制限を受けない。

A i の含硫アミノ酸の置換変異体を作製し、その活性を調べると、野性型酵素と同等もしくはそれ以上の活性を示す変異体が p 個見いだされる。そのアミノ酸を、 B i j ($j = 1, \sim p$) とする。ただし、 A i / B i j 置換変異体の活性を高いものから並べるものとする。即ち、 $\text{A i / B i 1} > \text{A i / B i 2} > \text{A i / B i 3} > \dots > \text{A i / B i p}$ の順に変異体の活性が小さくなるものとする。

A i / B i j 置換変異のうち、活性の高いものから最大 3 個の置換変異、即ち、 A i / B i 1 、 A i / B i 2 、及び A i / B i 3 を選ぶ。

全ての i ($i = 2 \sim n$) について同じように選び、それらの変異と A 1 / M A 1 の変異を全て組み合わせた最大 $3 \times (n - 1)$ 個の変異体を作製し、 $3 \times (n - 1)$ 個の変異体の活性を調べ、野性型酵素の活性と同等もしくは優れたものを選ぶ。

このようにして得られる変異酵素は、含硫アミノ酸を含まないことが明らか

である。

また、このようにして作製される野性型酵素と同等もしくはそれ以上の活性を示す含硫アミノ酸を含まない酵素は、過酸化水素などの処理により酸化を受けにくいという特徴を有する全く新規な酵素である。

以上第1の方法を、ここでは「組み合わせ変異による含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」と呼ぶ。

また、本発明の野性型酵素と同等もしくはそれ以上の活性を示す含硫アミノ酸を含まない酵素は、次に示す第2の方法によっても作製することができる。

前記第1の方法に従いA1/MA1変異体を作製する。

次に、同様にA1/MA1変異体のA2の含硫アミノ酸を含硫アミノ酸以外の他のアミノ酸（最大18種）に置換した2重変異体（最大18種）をそれぞれ作製し、その酵素活性を調べる。

2重変異体の活性を調べると、野性型と同等もしくはそれ以上の活性を示す変異体が見いだされる。2重変異のうち活性の高いものから最大3個の2重変異体を選ぶ。

次に、得られた2重変異体のそれぞれのA3の含硫アミノ酸を含硫アミノ酸以外の他のアミノ酸（最大18種）に置換した3重変異体をそれぞれ作製し（最大、 $3 \times 18 = 54$ 種）、その酵素活性を調べる。

3重変異体の活性を調べると、野性型と同等もしくはそれ以上の活性を示す変異体が見いだされる。

以下同様に、4重、・・・、n重変異体を作製する。最後のn重変異体が、目的の含硫アミノ酸を含まない酵素である。

なお、説明の都合で、変異する部位の順番を、A1、A2、・・・、Anとしたが、変異の順番は、順列組み合わせの種類（n！通り）のうちどれか一つを適当に選ぶものとする。

以上第2の方法を、ここでは「段階的変異による含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」と呼ぶ。

「段階的変異による含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」においては、最大 $[4(A1) + 18(A2) + 54 \times (n-2)(A3 \sim An)]$ の変異

体を調べることになる。

また、本発明の野性型酵素と同等もしくはそれ以上の活性を示す含硫アミノ酸を含まない酵素は、「組み合わせ変異による含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」と「段階的変異による含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」を部分的に組み合わせた方法（ここでは「組み合わせ変異と段階的変異との組み合わせによる含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」と呼ぶ）を用いても作製できることは自明であろう。

本発明の硫黄原子を含まない酵素蛋白質の作製のためには、対象とする野性型酵素のアミノ酸配列及び塩基配列の情報が有れば十分である。例えば、塩基配列の情報に従いPCRプライマーを合成し、野性型酵素を生産する細胞のDNAもしくはcDNAもしくは組み換えプラスミドDNAを鋳型として、PCR法により野性型酵素をコードするDNAを合成することできる。また、塩基配列を元に化学合成によっても野性型酵素をコードするDNAを作製することができる。このようにして得られた野性型酵素をコードするDNAに、本発明に示される方法に従って変異を施すことにより本発明を行うことができる。従って、本発明は野性型酵素の遺伝子によって制限を受けない。

本発明の実施例においては、酸化還元酵素の代表例として、大腸菌由来のジヒドロ葉酸還元酵素（DHFRと略す）のシステインフリー変異体（AS-DHFRと略す）を出発物質として、AS-DHFR中に5個含まれるメチオニンを他のアミノ酸に置き換えて、2個のシステイン残基及び5個のメチオニン残基を含む野性型DHFRの酵素活性を遙かに凌ぐ高活性型の含硫アミノ酸を含まないDHFRの作製を示している。また、加水分解酵素の代表例として、枯草菌由来のキシラナーゼに含まれる2個のメチオニンを他のアミノ酸に置き換えて、野性型酵素と同等の活性を示す含硫アミノ酸を含まないキシラナーゼの作製を示している。

また、配列表配列番号1に、AS-DHFRのアミノ酸配列を、配列表配列番号2に、制限酵素BamHIで切り出し可能で且つ大腸菌の適当なベクターのBamHI部位に導入することにより大腸菌で高発現可能な遺伝子配列を、配列表配列番号3に枯草菌由来のキシラナーゼのアミノ酸配列を、配列表配列番号4に枯草菌由来のキシラナーゼをコードするDNA配列をそれぞれ示している。

配列表配列番号2のDNAは、本発明者らが報告した配列（Journal of Biochemistry vol. 117, p. 480-488 (1995) に記載）を持つ組み換えプラスミドpTZDHFR20を鋳型として、例えば、5'-ggatccttgcacaatttagttactat-3' と 5'-ggatccttaacgacgcgtcgaggat-3' の2つのプライマーDNAを用いてPCR法を用いて作製できる。また、配列番号2の配列に基づいて化学合成法によっても作製できる。

配列表配列番号4のDNAは、枯草菌の染色体DNAから、例えば、5'-gcttagcacag actactggcaaaat-3' と 5'-ttaccatacgtaacatcgacg-3' に示すプライマーDNAを用いてPCR法を用いて作製できる。本発明では、枯草菌の染色体DNAとして、シグマ社が販売している染色体DNA（製品番号D4041）を用いて分離したものを用いている。また、配列番号4の配列に基づいて化学合成法によっても作製できる。

AS-DHFRは159個のアミノ酸より構成されるが、このうち1、16、20、42、及び92番目のアミノ酸がメチオニンである。これらのメチオニンを他のアミノ酸に置換した酵素を作製する方法として、実施例においては「組み合わせ変異と段階的変異との組み合わせによる含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」を用いた方法を示している。

表1～5は、AS-DHFRの1、16、20、42及び92番目のメチオニンを他のアミノ酸に置換した変異体の酵素活性を示す表であり、そして、表6はAS-DHFRの42番目及び92番目のメチオニンを他のアミノ酸で置換した変異体の酵素活性、

表7はAS-DHFRの16番目及び20番目のメチオニンを他のアミノ酸で置換した変異体の酵素活性を示す表である。

1番目のメチオニンに関しては、前記の方法に従い、3種類の変異体を作製したところ、メチオニンーアラニンが最適なものとして選ばれた。（表1参照）この変異体を、AS-DHFR-A1と名付けた。

AS-DHFRの16、20、42、及び92番目のメチオニンに関しては、それぞれメチオニンのコドンであるATGをNNY（NはA, T, G, Cの塩基を表し、Yは、T, Cの塩基を表す。）にえた配列を有するプライマーを用いてランダム塩基置換変異体を

作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した。その結果、16番目のアミノ酸として好適なものとして、アラニン、フェニルアラニン、アスパラギンが、20番目のアミノ酸として好適なものとして、イソロイシン、ロイシン、バリンが、42番目のアミノ酸として好適なものとして、バリンとチロシンが、92番目のアミノ酸として好適なものとして、フェニルアラニンとイソロイシンがそれぞれ示された。（表2～5参照）

次に、42番目のアミノ酸として好適なアミノ酸であるバリンとチロシンと、92番目のアミノ酸として好適アミノ酸であるフェニルアラニンとイソロイシンとを組み合わせることにより、AS-DHFR-A1の42及び92番目のアミノ酸置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した結果、42番目がチロシンで92番目がフェニルアラニンの組合せが最も高い活性を示した（野性型酵素の約3倍）。この変異体を、AS-DHFR-A1-M42Y-M92Fと名付けた。（表6参照）

次に、16番目のアミノ酸として好適なアミノ酸であるアラニン、フェニルアラニン、アスパラギンと、20番目のアミノ酸として好適アミノ酸であるイソロイシン、ロイシン、バリンとを組み合わせることにより、AS-DHFR-A1-M42Y-M92Fの16及び20番目のアミノ酸置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した。その結果、表7に示す様に、野性型酵素の活性を越える変異体酵素が得られた。その中でも、16番目がアスパラギンで20番目がロイシンの組み合せが最も高い活性を示した（野性型酵素の約12倍）。この変異体を、ANLYFと名付けた（AS-DHFRのM1MA、M16N、M20L、M42Y、M92Fの各メチオニン部位の変異の一文字表記にちなんだ。以下、同様の表記を用いた）。

ANLYF以外にも、野性型酵素より高い活性を示す硫黄原子を含まない変異体として、AFLYF、AFIYF、ANIYF、AFVYF、ANVYFなど計9個の変異体が得られた。

この結果は、硫黄原子を含まない酵素蛋白質として多くの可能性が有ることを示している。少なくとも本発明の方法に従って野性型酵素配列を変換していくことにより、野性型酵素より高い活性を示す硫黄原子を含まない酵素に到達できる。このように、本発明の有効性が証明された。

キシラナーゼは、185アミノ酸より構成されるが、このうち158及び169番目

のアミノ酸がメチオニンである。これらのメチオニンを他のアミノ酸に置換した酵素を作製する方法として、実施例においては「段階的変異による含硫アミノ酸を含まない酵素の作製方法」を用いた方法を示している。

具体的には、上記ANLYFのカルボキシ末端とキシラナーゼのアミノ末端を Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly の配列でつなぎ融合蛋白質（これを NL-キシラナーゼと名付けた）を作製した。NL-キシラナーゼANLYF部分及びリンカー部分にはメチオニン及びシステインのいずれも含まれない。ANLYFと融合させることによりNL-キシラナーゼ変異体融合遺伝子が導入された形質転換株をトリメトプリム耐性で選択できること及びキシラナーゼの活性とDHFR活性とを測定し、[キシラナーゼの活性]/[DHFR活性]の値を計算することにより、NL-キシラナーゼ変異体の蛋白質量を測定しなくともキシラナーゼ変異体の活性と野性型キシラナーゼの活性を比較できるという特徴を有する。

NL-キシラナーゼのキシラナーゼ部分の158番目のメチオニンのコドンであるatgをnny（nはa, c, g, tの塩基を表し、yは、t, cの塩基を表す。）に変えた配列を有するプライマーを用いてランダム塩基置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した結果、ロイシンに置換した変異体が野性型の127%の活性を示した。この変異体を、NL-キシラナーゼ(M158L)と名付けた。

次に、NL-キシラナーゼ(M158L)のキシラナーゼ部分の168番目のメチオニンのコドンであるatgをnny（nはa, c, g, tの塩基を表し、yは、t, cの塩基を表す。）に変えた配列を有するプライマーを用いてランダム塩基置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した。その結果、イソロイシンに置換した変異体が野性型の151%の活性を示した。この変異体を、NL-キシラナーゼ(M158L, M169I)と名付けた。

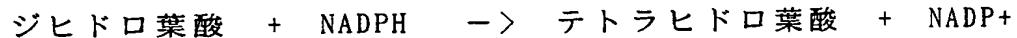
得られたNL-キシラナーゼ(M158L, M169I)のDHFR部分、リンカー部分、及びキシラナーゼのいずれの部分にも、含硫アミノ酸であるシステイン及びメチオニンを含まない。それにも係わらず、DHFRおよびキシラナーゼのそれぞれの酵素活性は、それぞれ対応する野性型酵素よりも高い活性を示した。

DHFRは、ニコチンアミド補酵素を要求する酸化還元反応を触媒するいわゆる

酸化還元酵素であり、キシラナーゼは、高分子多糖を加水分解反応を触媒するいわゆる加水分解酵素である。本発明において示す2例の実施例が示すことは、酸化還元反応と加水分解反応という全く異なった反応を触媒する酵素において、含硫アミノ酸を全く含まないようにしてしても、生物進化において生じた野性型酵素を越える活性を有する酵素が作れることである。このことから、野性型酵素に含まれる含硫アミノ酸の全てを他のアミノ酸に置換した蛋白質の中には、野性型酵素の活性を越えるもしくは同等の活性を示すものが存在するものと考えられる。本発明は、そのような含硫アミノ酸を全く含まない酵素に至る確実な方法を提供するものである。従って、本発明が、本明細書に記載の含硫アミノ酸を全く含まない酵素の作製方法によって作製可能な含硫アミノ酸を全く含まない全ての酵素を含むことは、自明である。

本発明のジヒドロ葉酸還元酵素は、次の反応式1で表される

(反応式1)

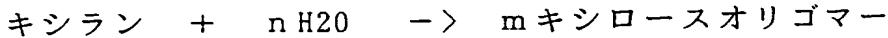


を触媒する。(上記反応式において、「→」は矢印を意味する、以下同様)

ジヒドロ葉酸還元酵素の活性は、反応に伴う基質の減少を、340nmの吸光度の減少で追跡することができる。本発明において、酵素反応液の組成を、50mMリン酸緩衝液(pH7)、0.1mM NADPH、0.05mMジヒドロ葉酸、12mM2-メルカプトエタノール、及び適当量の酵素とし、酵素反応液1mlを分光光度計用のキュベットにとり、酵素液を加えることにより反応を開始し、340nmの吸光度の1分間あたりの変化量を測定し、この量を持って活性の指標とした。

本発明のキシラナーゼは、次の反応式2で表される

(反応式2)



を触媒する。

キシラナーゼの活性は、生成するオリゴキシロースの還元末端に由来する還元力の増加をネルソンソモギ法により測定することによって行うことができる。本発明において、酵素反応液の組成を、50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)、2mg/mlオート麦由来のキシラン、及び適当量の酵素とし、酵素反応液

0.25mlを試験管にとり、酵素液を加えることにより反応を開始し、10分間反応を行い、0.25mlの銅-アルカリ試薬を加えた後、沸騰水中で10分間保持し、その後室温に冷却した後砒素-モリブデン酸試薬0.25mlを加え、着色させる。着色の強さを500nmの吸光度により測定し、対照試料の吸光度との差を求め、酵素活性の指標とした。

酵素活性の測定方法としては、種々の方法が開発され利用されていることは公知の事実であり、目的とする酵素の活性測定法によって本発明が制限を受けないことは明白である。

本発明によって製造された、硫黄原子を含まないジヒドロ葉酸還元酵素及びジヒドロ葉酸還元酵素-キシラナーゼ融合蛋白質は、過酸化水素により容易に酸化されるシステイン及びメチオニンを配列に含まないため、0.1Mの高濃度の過酸化水素水を用いて処理しても酸化されることは無く、酸化に対する抵抗性が著しく増大した。ジヒドロ葉酸還元酵素及びジヒドロ葉酸還元酵素-キシラナーゼ融合蛋白質いずれにおいても、硫黄原子を含む酵素の場合、0.1Mの過酸化水素水で処理することにより、全ての硫黄分子が酸化され、このことにより酵素活性が約10分の1以下に低下する。このように抗酸化性を高めることにより酵素の形質の安定性に寄与できることが実証されている。

発明を実施するための最良の形態

以下に、実施例により本発明を説明するが、これらの具体例は本発明を限定するものではない。

なお、本実施例における、PCR法によるDNAの增幅反応、制限酵素によるDNAの切断反応、T4-DNAリガーゼ、大腸菌への形質転換によるDNAの結合反応は、市販のPCRキット、制限酵素、T4-DNAリガーゼ、及び大腸菌コンピテントセルに添付している標準プロトコールに従って行った。

[実施例1] 硫黄原子を含まないジヒドロ葉酸還元酵素の作製

硫黄原子を含むジヒドロ葉酸還元酵素として本実施例においては、AS-DHFRを用いている。AS-DHFRの酵素活性安定性などの性質は、野生型酵素とほぼ一致している。(M. Iwakura, B. E. Jones, J. Luo, & C. R. Matthews, J.

Biochemistry, 117, 480-488 (1995) に記載)

AS-DHFRのアミノ酸配列及びその遺伝子の塩基配列をそれぞれ配列表配列番号1及び配列表配列番号2に示す。

AS-DHFRの遺伝子は「pTZDHFR20」と名付けられたプラスミドに組み込まれている(M. Iwakura, B. E. Jones, J. Luo, & C. R. Matthews, J. Biochemistry, 117, 480-488 (1995) に記載)。

2本の化学合成プライマーDNA:

5'-ggggatccttgcacaatttagttactatgttataatgtattc -3' 及び

5'-ggggatcccttatgcacagccaccgcaccacgacgctcgaggatttcg-3'

を用いることにより、pTZDHFR20を錆型として、PCR法により増幅することにより、制限酵素BamHIで切り出すことができ、且つAS-DHFRを発現できる遺伝子配列を作製した(これを、DNA1とする)。

PCR法により増幅したDNA配列を錆型として、1番目のアミノ酸であるメチオニンをL-メチオニン-L-アラニン、L-メチオニン-L-セリン、もしくはL-メチオニン-L-プロリンに変異する遺伝子の作製を行った。そのため、
2本の化学合成プライマーDNA:

5'-ggggatccttgcacaatttagttactatgttataatgtattc -3' 及び

5'-cgcaatcagactatnncatggaagtccctcccttcggatt-3'

(ただし、nはa, c, g, tの塩基を表わす。)を用いてPCR法により増幅したDNA(これをDNA2とする。)と2本の化学合成プライマーDNA:

5'-ggaggaacttccatgnncatcagtcgttgcggcgctagcgtagat-3'

(ただし、nはa, c, g, tの塩基を表わす。)及び

5'-ggggatcccttatgcacagccaccgcaccacgacgctcgaggatttcg-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA(これをDNA3とする。)を作製し、次に、DNA2とDNA3を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA:

5'-ggggatccttgcacaatttagttactatgttataatgtattc -3' 及び

5'-ggggatcccttatgcacagccaccgcaccacgacgctcgaggatttcg-3'

を用いてPCR法により増幅して得られたDNA(これをDNA4とする。)を作製した。

DNA4をBamHIで切断した後、市販のプラスミドベクターpUC19をBamHIで切断

したものとを合わせ、両者をT4-DNAリガーゼで結合し、組み換えプラスミドを作製した。得られた組み換えプラスミドを用いて大腸菌JM109株を形質転換し、寒天培地1(11あたり5gの食塩、5gの酵母エキス、8gのトリプトン、100mgのアンピシリンナトリウム、50mgトリメトプリム、及び15gの寒天を含んでいる)で生育する変異株を選択した。寒天培地1で形成したコロニー15個について、プラスミドを分離し、その塩基配列を決定することにより、1番目のアミノ酸であるメチオニンをL-メチオニン-L-アラニン、L-メチオニン-L-セリン、もしくはL-メチオニン-L-プロリンに変異した遺伝子が組み込まれた形質転換株を分離した。分離した形質転換株それぞれを培地1(11あたり5gの食塩、5gの酵母エキス、8gのトリプトン、及び100mgのアンピシリンナトリウムを含んでいる)で37度で一晩培養し、660nmの吸光度が1に合わせ、その培養液1mlから菌体を収集し、0.2mlの10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁し、音波破碎後、遠心分離によって得られた上清についてそのDHFR酵素活性を調べた。その結果を表1に示す。

以下の表において、DHFR活性は野生型酵素の活性を100%として、%で表示したものである。

表 1

[変異の種類]	[DHFR活性]
L-メチオニン-L-アラニン (AS-DHFR-A1)	103
L-メチオニン-L-セリン	98
L-メチオニン-L-プロリン	89

この結果、1番目のアミノ酸の変異としてL-メチオニン-L-アラニンが適していることが示された(この変異体をAS-DHFR-A1と称する。また、AS-DHFR-A1の遺伝子を組み込んだ組み換えプラスミドを、pAS-DHFR-A1と称する)。また、AS-DHFR-A1を高度に精製して、アミノ末端の配列を調べたところ、99%以上がアラニンであり、遺伝子配列上の開始コドンに由来するメチオニン

は、大腸菌を用いて発現する際に、メチオニルアミノペプチダーゼ (methionyl-aminopeptidase) によりほぼ完全に切除されたことが示された。

AS-DHFRの16、20、42、及び92番目のメチオニンに関しては、それぞれメチオニンのコドンであるatgをnnn (nはa, c, g, tの塩基を表し、rはa, gの塩基を、yはc, tの塩基を表す。) に変えた配列を有するプライマーを用いてランダム塩基置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した。

16番目のメチオニンの変異体の作製には、DNA1を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA：

5'-ggggatccctttgacaattttttttttataatgttttc -3' と

5'-ggcatggcggttttcrnngccgataacgcgttaccgctta-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA5とする。）と2本の化学合成プライマーDNA：

5'-gatcgcggttatcggnnygaaaacgcgttaccgttac-3' 及び

5'-ggggatcccttatgcacagccaccgcaccacgcgttcgaggatcg-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA6とする。）を作製し、次に、DNA5とDNA6を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA：

5'-ggggatccctttgacaattttttttttataatgttttc -3' 及び

5'-ggggatcccttatgcacagccaccgcaccacgcgttcgaggatcg-3'

を用いてPCR法により増幅して得られたDNA（これをDNA7とする。）を作製した。

DNA7をBamHIで切断した後、前記と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べ、その結果を表2に示した。

表 2

[変異の種類] [DHFR活性]

(16番目のアミノ酸)

L-アラニン	99
L-アスパラギン酸	9.5
L-フェニルアラニン	234
グリシン	31

L-ヒスチジン	44
L-イソロイシン	52
L-ロイシン	30
L-アスパラギン	100
L-プロリン	1.7
L-アルギニン	60
L-セリン	95
L-トレオニン	61
L-バリン	34
L-チロシン	73

この結果から、16番目のアミノ酸として好適なものとして、アラニン、フェニルアラニン、アスパラギンが、示された。

20番目のメチオニンの変異体の作製には、DNA1を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA：

5'-ggggatccctttgacaatttagttaactatgttataatgttttc-3' と

5'-aggcagggttccatggrrnnggcgtttccatgccgataac-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA8とする。）と2本の化学合成プライマーDNA：

5'-ggcatggaaaacgcnnnyccatggAACCTGCCTGCCGATC-3' 及び

5'-ggggatcccttatgcacagccaccgcaccacgacgctcgaggatttcg-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA9とする。）を作製し、次に、DNA8とDNA9を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA：

5'-ggggatccctttgacaatttagttaactatgttataatgttttc-3' 及び

5'-ggggatcccttatgcacagccaccgcaccacgacgctcgaggatttcg-3'

を用いてPCR法により増幅して得られたDNA（これをDNA10とする。）を作製した。DNA10をBamHIで切断した後、前記と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べ、その結果を表3に示した。

表 3

[変異の種類] (20番目のアミノ酸)	[DHFR活性]
L-アスパラギン酸	3.7
グリシン	— 0.8
L-ヒスチジン	1.7
L-イソロイシン	182
L-ロイシン	283
L-プロリン	1.2
L-アルギニン	2
L-セリン	20
L-トレオニン	63
L-バリン	122
L-チロシン	46

この結果から、20番目のアミノ酸として好適なものとして、イソロイシン、ロイシン、バリンが示された。

42番目のメチオニンの変異体の作製には、DNA1を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA：

5'-ggggatcccttgcacaatttagttaactatggttataatgtattc-3' と

5'-ccaggtatggcgcccrnnaatcacgggttatataagggtg-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA11とする。）と2本の化学合成プライマーDNA：

5'-aataaaccgtgattnnyggcgccataacctggaaatcaa-3' 及び

5'-ggggatcccttatgcacagccaccgcccaccacgacgctcgaggatttcg-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA12とする。）を作製し、次に、DNA11とDNA12を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA：5'-ggggatcccttgcacaatttagttaactatggttataatgtattc-3' 及び 5'-ggggatcccttatgcacagccaccgcccaccacgacgctcgaggatttcg-3'

を用いてPCR法により増幅して得られたDNA（これをDNA13とする。）を作製した。DNA13をBamHIで切断した後、前記と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べ、その結果を表4に示した。

表 4

[変異の種類]	[DHFR活性]
(42番目のアミノ酸)	
L-アラニン	63
L-フェニルアラニン	49
グリシン	5.5
L-トレオニン	14
L-バリン	71
L-チロシン	167

この結果から、42番目のアミノ酸として好適なものとして、バリンとチロシンが示された。

92番目のメチオニンの変異体の作製には、DNA 1 を鋳型として、2本の化学合成プライマ一DNA:

5'-ggggatcccttgcacaatttagttaactatggttataatgtttc -3' 与
5'-tccggccgcctaatcacrnnngattctgttacgttacccgtcg-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA14とする。）と2本の化学合成プライマ-DNA：

5' -gacgttaccagaaatcnnnygtattggcggcggacgcgtt-3' 及び

5' -ggggatcccttatgcacagccaccggccaccacgacgtcgaggatttcg-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA15とする。）を作製し、次に、

DNA14とDNA15を同量混合したのち、2本の化学合成プライマ—DNA: 5'-

ggggatccctcttgacaatttagtttaactatttgttataaatgtatcc -3' 及び

5' -ggggatcc ttatgcacagccaccggccaccacgacgctcgaggatttcg-3'

を用いてPCR法により増幅して得られたDNA（これをDNA16とす

た。DNA16をBamHIで切断した後、前記と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べ、その結果を表5に示した。

表 5

[変異の種類] [DHFR活性]
(92番目のアミノ酸)

L-アスパラギン酸	34
L-フェニルアラニン	69
グリシン	0.2
L-イソロイシン	37
L-アルギニン	0.5

この結果から、92番目のアミノ酸として好適なものとして、フェニルアラニンとイソロイシンが示された。

次に、AS-DHFR-A1の42番目のアミノ酸として好適なアミノ酸であるバリンとチロシンと、92番目のアミノ酸として好適アミノ酸であるフェニルアラニンとイソロイシンとを組み合わせることにより、AS-DHFR-A1の42及び92番目のアミノ酸置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した。

pAS-DHFR-A1を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA：

5'-ggggatccctcttgacaatttagttactatgttataatgtattc-3' と

5'-ccaggtatggcgcccrwmaatcacggtttatttaaggtg-3'

(rはaとgの塩基を、wはaとtの塩基を、mはaとcの塩基を表す、以下同様)を用いてPCR法により増幅したDNA(これをDNA17とする。)と2本の化学合成プライマーDNA：

5'-aataaaccgtgattkwyggcgccataacctggaatcaa-3'

(kはgとtの塩基を、wはaとtの塩基を、yはcとtの塩基を表す、以下同様)及び

5'-ggggatcccttatgcacagccaccgcccaccacgacgtcgaggatttcg-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA(これをDNA18とする。)を作製し、次に、DNA17とDNA18を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA：

5'-ggggatccttgcacaatttagttaactatgttataatgtattc -3' 及び
 5'-ggggatcccttatgcacagccaccgcaccacgacgctcgaggatttcg-3'
 を用いてPCR法により増幅して得られたDNA（これをDNA19とする。）を作製した。

得られたDNA19を錆型として、2本の化学合成プライマーDNA：

5'-ggggatccttgcacaatttagttaactatgttataatgtattc -3' と
 5'-tccggcccaatcacrawgatttctggtaacgtcacctgcg-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA20とする。）と2本の化学合成プライマーDNA：

5'-gacgtaccagaaaatcwtiygtgattggcgccggacgcgtt-3' 及び
 5'-ggggatcccttatgcacagccaccgcaccacgacgctcgaggatttcg-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA21とする。）を作製し、次に、DNA20とDNA21を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA：5'-ggggatccttgcacaatttagttaactatgttataatgtattc -3' 及び
 5'-ggggatcccttatgcacagccaccgcaccacgacgctcgaggatttcg-3'

を用いてPCR法により増幅して得られたDNA（これをDNA22とする。）を作製した。

DNA22をBamHIで切断した後、前記と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べ、その結果を表6に示した。

表 6

〔変異の種類〕		〔DHFR活性〕
(42番目のアミノ酸)	(92番目のアミノ酸)	
L-チロシン	L-フェニルアラニン	320
L-チロシン	L-イソロイシン	61.3
L-バリン	L-フェニルアラニン	102
L-バリン	L-イソロイシン	58.9

この結果、42番目がチロシンで92番目がフェニルアラニンの組み合わせが最

も高い活性を示した（野性型酵素の約3倍以上）。この変異体を、AS-DHFR-A1-M42Y-M92Fと称する。また、AS-DHFR-A1-M42Y-M92Fの遺伝子を組み込んだ組み換えプラスミドを、pAS-DHFR-A1-M42Y-M92Fと名付けた。

AS-DHFR-A1-M42Y-M92Fの16番目のアミノ酸として好適なアミノ酸であるアラニン、フェニルアラニン、アスパラギンと、20番目のアミノ酸として好適アミノ酸であるイソロイシン、ロイシン、バリンとを組み合わせることにより、AS-DHFR-A1-M42Y-M92Fの16及び20番目のアミノ酸置換変異体を作製し、得られた変異体の塩基配列と酵素活性を測定した。

pAS-DHFR-A1-M42Y-M92Fを鋳型として、3本の化学合成プライマーDNA：5'-ggggatcctcttgacaatttagttaactatgttataatgtattc-3' と

5'--aggcaggttccacggrkwggcggttttcrytgcgcataacgcgatctaccg-3' と

5' -aggcaggttccacggrkwggcggtttctgcgcgcataacgcgatctaccg-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA23とする。）と3本の化学合成プライマーDNA：

5' -gatcgcgttatcgccarygaaaacgcwmyccgtgaaacctgcctgccga-3' と

5' -gatcgcgttatcgccgcagaaaacgcwmyccgtgaaacctgcctgccga-3' と

5' -ggggatcccttatgcacagccaccgcaccacgacgctcgaggatttcg-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA24とする。）を作製し、次に、DNA23とDNA24を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA：5'-ggggatcctcttgacaatttagttaactatgttataatgtattc-3' 及び

5' -ggggatcccttatgcacagccaccgcaccacgacgctcgaggatttcg-3'

を用いてPCR法により増幅して得られたDNA（これをDNA25とする。）を作製した。

DNA25をBamHIで切断した後、前記と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べ、その結果を表7に示した。

表 7

〔変異の種類〕

(16番目のアミノ酸) (20番目のアミノ酸)

L-アラニン

L-イソロイシン

〔DHFR活性〕

240

L-アラニン	L-ロイシン	579
L-アラニン	L-バリン	102
L-フェニルアラニン	L-イソロイシン	176
L-フェニルアラニン	L-ロイシン	745
L-フェニルアラニン	L-バリン	163
L-アスパラギン	L-イソロイシン	102
L-アスパラギン	L-ロイシン	989
L-アスパラギン	L-バリン	127

この結果、16番目がアスパラギンで20番目がロイシンの組み合わせが最も高い活性を示した（野性型酵素の約10倍）。この変異体を、ANLYFと称する。また、ANLYFの遺伝子を組み込んだ組み換えプラスミドを、pANLYFと名付けた。他の8個の変異体も野性型酵素を越える活性を示した。この結果は、硫黄原子を含まない酵素蛋白質として多くの可能性が有ることを示している。

配列表配列番号5に、ANLYFのアミノ酸配列を、配列表配列番号6に、制限酵素BamHIで切り出し可能で且つ適当なベクターのBamHI部位に導入することにより大腸菌で高発現可能なANLYF遺伝子配列をそれぞれ示している。

pANLYFを含む大腸菌を、3リッターの培地（15gの食塩、15gの酵母エキス、24gのトリプトン、30mgのアンピシリンナトリウムを含んでいる）で、37度で一晩培養し、湿重量約10gの菌体を得た。この菌体の無細胞抽出液に、ストレプトマイシン硫酸処理、硫安分画、メソトレキセートアフィニティクロマトグラフィー及びDEAEトヨパールクロマトグラフィーの精製操作を施すことにより、均一にまで蛋白質を精製し、約100mgの均一なANLYFが得られた。アミノ末端分析を行ったところ、ANLYFのアミノ末端の配列は、L-アラニン-L-イソロイシン-L-セリン-L-ロイシン-L-イソロイシンであり、開始コドンに由来するL-メチオニンが取り除かれた配列をしていた。精製して得られた1mgのANLYFを0.1Mの過酸化水素水含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で室温で一晩放置し、その分子量を調べたところ、処理していないANLYFの分子量と全く同じ値、17,905(計算値17,903)を示した。また、酵素活性も全く変化し

なかった。一方、同様の処理をAS-DHFRにしたところ、過酸化水素水処理前の分子量が17,954(計算値17,950)、過酸化水素水処理後の分子量が18,034であり、全てのメチオニンがメチオニンスルホオキサイドに酸化されたことが示された。また、全てのメチオニンが酸化されることによりAS-DHFRの酵素活性が約5分の1に低下した。このように、硫黄原子を含まなくすることにより、抗酸化性が付与されたことが示された。

[実施例2] 硫黄原子を含まないジヒドロ葉酸還元酵素-キシラナーゼ融合酵素の作製

ジヒドロ葉酸還元酵素とキシラナーゼの融合遺伝子の作製のために、ジヒドロ葉酸還元酵素の遺伝子部分として配列表配列番号6の配列の1から560番目の配列を用い、キシラナーゼ遺伝子部分として、枯草菌の染色体DNAとして、シグマ社が販売している染色体DNA(製品番号D4041)を鑄型として、2本の化学合成プライマーDNA:

5'-gctagcacag actactggcaaaat-3' と

5'-ttaccatacggttaacattcgacg-3'

を用いてPCR法により増幅して得られたDNA(これをDNA26とする。)を作製し、これをGly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Glyのコドンに対応する塩基配列で結合した融合遺伝子を作製した。

まず、pNALYFを鑄型とし、2本の化学合成プライマーDNA:

5'-ggggatcccttgcacaatttagttaactatttgtataatgtattc-3' 及び

5'-gccgccaccacccgagccaccggccaccacgacgctcgaggatttcgaacgaata-3'

を用いてPCR法により増幅して得られたDNA(これをDNA27とする。)を作製した。次に、DNA26を鑄型とし、2本の化学合成プライマーDNA:

5'-ggtggcggtggctcggtggcgctagcacagactactggcaaaattggactgat-3' 及び

5'-ggggatccattaccatacggttaacattcgacgagccactactttga-3'

を用いてPCR法により増幅して得られたDNA(これをDNA28とする。)を作製した。DNA27とDNA28を同量混合したのち、2本の化学合成プライマーDNA: 5'-

ggggatcctttgacaatttagtaactatttgttataatgtattc-3' 及び
 5'-ggggatccttaccatacgtaacattcgacgagccactacttga-3'
 を用いてPCR法により増幅して得られたDNA（これをDNA29とする。）を作製した。

DNA29をBamHIで切断した後、前記と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを10個取り、組み換えプラスミドを分離し、プラスミドに組み込んだ部分の塩基配列を調べ、目的の配列が組み込まれた組み換えプラスミドを分離し、これをpNLXYL-wtと名付けた。

配列表配列番号7に、ジヒドロ葉酸還元酵素-キシラナーゼ融合酵素のアミノ酸配列を、配列表配列番号8に、制限酵素BamHIで切り出し可能で且つ適当なベクターのBamHI部位に導入することにより大腸菌で高発現可能なジヒドロ葉酸還元酵素-キシラナーゼ融合酵素遺伝子配列をそれぞれ示している。配列表配列番号7の配列中1から159番目の配列がジヒドロ葉酸還元酵素（ANLYF変異体）の部分で、160から168番目の配列がジヒドロ葉酸還元酵素とキシラナーゼを無理なくつなぐためのリンカー配列であり、169から353番目の配列が野性型キシラナーゼの配列である。

キシラナーゼは、185アミノ酸より構成されるが、このうち158及び169番目のアミノ酸がメチオニンである。従って、ジヒドロ葉酸還元酵素-キシラナーゼ融合酵素においては、326番目と337番目の配列がメチオニンである。このジヒドロ葉酸還元酵素-キシラナーゼ融合酵素においてこれ以外に含硫アミノ酸は存在しない。

ジヒドロ葉酸還元酵素-キシラナーゼ融合酵素の326番目のメチオニンの変異体の作製には、pNLXYL-wtを鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA:
 5'-ggggatcctttgacaatttagtaactatttgttataatgtattc-3' と
 5'-gacttggtaagccaaattactgcccagattgnntccatggctttccatgcgtt-3'
 を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA30とする。）を作製した。DNA30を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA:
 5'-ggggatcctttgacaatttagtaactatttgttataatgtattc-3' と
 5'-actttgatataccttctgtcgccatgacttggtaagccaaattactgcccagatt-3'

を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA31とする）を作製した。更に、DNA31を鑄型として、2本の化学合成プライマーDNA：

5'-ggggatcctcttgcacaatttagttaactatttgtataatgtattc -3' と

5'-ggggggatcccttaccatacgtaaacattcgacgagccactactttgatatccttctgtcg-3' を用いてPCR法により増幅したDNA（これをDNA32とする）を作製した。DNA32をBamHIで切断した後、前記と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べた。また、各変異体のキシラナーゼ活性も同時に調べた。

測定したキシラナーゼとジヒドロ葉酸還元酵素の活性から、[キシラナーゼの活性]/[DHFR活性]の値を計算し、pNLXYL-wtを保有する菌体が示す[キシラナーゼの活性]/[DHFR活性]の値（これを野性型酵素の活性とする）と比較した。その結果を表8に示す。以下の表において、[キシラナーゼの活性]/[DHFR活性]は野生型酵素の活性を100%として、%で表示したものである。

表8

[変異の種類] (326番目のアミノ酸)	[キシラナーゼの活性]/[DHFR活性]
L-アスパラギン酸	0.0
L-フェニルアラニン	112
L-ヒスチジン	5.9
L-イソロイシン	66
L-ロイシン	127
L-アスパラギン	100
L-セリン	7.9
L-トレオニン	0.7
L-バリン	58

この結果から、326番目のアミノ酸として好適なものとして、ロイシンが示された。

この変異体を、NL-キシラナーゼ(M158L)と名付けた。また、NL-キシラナーゼ(M158L)の遺伝子を組み込んだ組み換えプラスミドを、pNLXYL-M158Lと名付け

た。

NL-キシラナーゼ (M158L) の337番目のメチオニンの変異体の作製には、pNLXYL-M158Lを鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA：
 5'-ggggatcctcttgcacaatttagtttaactatttgtataatgtattc-3' と
 5'-actttgatatccttcgtcgcnngacttggtaagcccaatttactgcccagatt-3'
 を用いてPCR法により増幅したDNA(これをDNA33とする。)を作製した。DNA33を鋳型として、2本の化学合成プライマーDNA：
 5'-ggggatcctcttgcacaatttagtttaactatttgtataatgtattc-3' と
 5'-ggggggatccttaccatacgtaacattcgacgagccactactttgatatccttcgtcgc-3' を用いてPCR法により増幅したDNA(これをDNA34とする。)を作製した。DNA34をBamHIで切断した後、前記と同様にして寒天培地1に生育するコロニーを調べた。また、各変異体のキシラナーゼ活性も同時に調べた。その結果を表9に示す。

表 9

[変異の種類] [キシラナーゼの活性] / [DHFR活性]
 (337番目のアミノ酸)

L-アスパラギン酸	0.1
グリシン	0.0
L-ヒスチジン	111
L-イソロイシン	151
L-アスパラギン	26
L-プロリン	1.7
L-アルギニン	0.0
L-トレオニン	0.7
L-チロシン	2.1

この結果から、326番目のアミノ酸として好適なものとして、イソロイシンが示された。

この変異体を、NL-キシラナーゼ(M158L, M169I)と名付けた。また、NL-キシラナーゼ(M158L, M169I)の遺伝子を組み込んだ組み換えプラスミドを、pNLXYL-LIと名付けた。

配列表配列番号9に、NL-キシラナーゼ(M158L, M169I)を、配列表配列番号10に、制限酵素BamHIで切り出し可能で且つ適当なベクターのBamHI部位に導入することにより大腸菌で高発現可能なNL-キシラナーゼ(M158L, M169I)をそれぞれ示している。

pNLXYL-LIを含む大腸菌を、3リッターの培地(15gの食塩、15gの酵母エキス、24gのトリプトン、30mgのアンピシリンナトリウムを含んでいる)で、37度で一晩培養し、湿重量約10gの菌体を得た。この菌体の無細胞抽出液に、ストレプトマイシン硫酸処理、硫安分画、メソトレキセートアフィニティクロマトグラフィー及びDEAEトヨパールクロマトグラフィーの精製操作を施すことにより、均一にまで蛋白質を精製し、約30mgの均一なNL-キシラナーゼ(M158L, M169I)が得られた。アミノ末端分析を行ったところ、NL-キシラナーゼ(M158L, M169I)のアミノ末端の配列は、L-アラニン-L-イソロイシン-L-セリシン-L-ロイシン-L-イソロイシン-であり、開始コドンに由来するL-メチオニンが取り除かれた配列をしていた。精製して得られた1mgのNL-キシラナーゼ(M158L, M169I)を0.1Mの過酸化水素水含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で室温で一晩放置し、その分子量を調べたところ、処理していないNL-キシラナーゼ(M158L, M169I)の分子量と全く同じ値、38,775(計算値38,773)、を示した。また、酵素活性も全く変化しなかった。一方、同様の処理を変異処理する前のジヒドロ葉酸還元酵素-キシラナーゼ融合酵素に対して行ったところ、過酸化水素水処理前の分子量が38,813(計算値38,809)、過酸化水素水処理後の分子量が38,845であり、全てのメチオニンがメチオニンスルホオキサイドに酸化されたことが示された。また、全てのメチオニンが酸化されることによりキシラナーゼの酵素活性が約3分の1に低下した。このように、硫黄原子を含まなくすることにより、抗酸化性が付与されたことが示された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、野生型酵素の活性を保持するとともに、過酸化水素等による酸化に対して耐性を有し、化学的に安定な酵素蛋白質、及びその製造方法が提供される。本発明の酵素蛋白質は、性状が安定していることから、バイオセンサー、バイオリアクター等の用途に幅広く使用することが可能なものであり、実用的価値の高いものである。

請求の範囲

1. L-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、及びL-トリプトファンの18種類のL-アミノ酸残基から構成される硫黄原子を含まない酵素蛋白質。
2. L-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、L-トリプトファン、L-システイン、及びL-メチオニンの20種類のL-アミノ酸残基から構成される酵素蛋白質のL-システイン及びL-メチオニン残基をL-アラニン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-リジン、L-ロイシン、L-アスパラギン、L-プロリン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-セリン、L-トレオニン、L-バリン、L-チロシン、及びL-トリプトファンの18種類のL-アミノ酸残基に置換した、元の酵素蛋白質の活性を保持し耐酸化性を有する請求項1に記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。
3. アミノ酸置換が合成DNAを使用した部位特異的変異法により行われたものである請求項2に記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。
4. 酵素活性が酸化還元活性、もしくは加水分解活性の機能を有することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。
5. ジヒドロ葉酸還元酵素活性を保持し耐酸化性を有することを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。
6. キシラナーゼの活性を保持し耐酸化性を有することを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の硫黄原子を含まない酵素蛋白質。
7. 次の工程からなる組み合わせ変異による硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

(1) 硫黄原子を含むアミノ酸（含硫アミノ酸）の配列上の位置がA_i（i = 1 ~ n）である、n個の含硫アミノ酸を含む全長m個のアミノ酸よりなる酵素蛋白質をコードするDNA配列のL-メチオニンをコードする開始コドンを、L-メチオニン-L-アラニン、L-メチオニン-L-セリン又はL-メチオニン-L-プロリンのコドンで置換した変異体遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、最も活性が高いものを選び得られる置換変異体をA₁ / MA₁とする；

(2) その他の部位のA_i（i = 2 ~ n）の含硫アミノ酸をコードするコドンを請求項1に記載の18種類の他のアミノ酸をコードするコドンで置換した変異遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、酵素活性を示すp個の変異体酵素蛋白質を選び得られる置換変異体をA_i / B_i _j（j = 1 ~ p）とする；

(3) 置換変異体のうち活性の高いものから最大3個の置換変異体A_i / B_i ₁、A_i / B_i ₂及びA_i / B_i ₃を選択するが、ここで置換変異体はA_i / B_i ₁ > A_i / B_i ₂ > A_i / B_i ₃ > · · · > A_i / B_i _pの順に活性が小さくなるものとする；

(4) 全ての部位A_i（i = 2 ~ n）の含硫アミノ酸について、(2)、(3)と同様にして活性を有する置換変異体を選択し、それらの変異体とA₁ / MA₁の変異体を全て組み合わせた最大3 × (n - 1)個の変異体を作成し、それらの酵素活性を測定して元の酵素蛋白質と同等以上の活性を有する変異体酵素蛋白質を作成する。

8. 次の工程からなる段階的変異による硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

(1) 硫黄原子を含むアミノ酸（含硫アミノ酸）の配列上の位置がA_i（i = 1 ~ n）である、n個の含硫アミノ酸を含む全長m個のアミノ酸よりなる酵素蛋白質をコードするDNA配列のL-メチオニンをコードする開始コドンを、L-メチオニン-L-アラニン、L-メチオニン-L-セリン又はL-メチオニン-L-プロリンのコドンで置換した変異体遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、最も活性が高い

ものを選び得られる置換変異体を A 1 / M A 1 とする；

(2) A 1 / M A 1 変異体の A 2 の含硫アミノ酸をコードするコドンを請求項 1 に記載の 18 種類の他のアミノ酸をコードするコドンで置換した変異遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた 2 重変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、活性の高いものから最大 3 個の 3 重変異体を選ぶ；

(3) 得られた 2 重変異体のそれぞれの A 3 の含硫アミノ酸をコードするコドンを請求項 1 に記載の 18 種類の他のアミノ酸をコードするコドンで置換した変異遺伝子を作成し、これを宿主細胞で発現して得られた 3 重変異体酵素蛋白質の酵素活性を測定し、活性の高いものから最大 3 個の 3 重変異体を選ぶ；

(4) 以下同様に、4 重、・・・、n 重変異体を作成し、最後の n 重変異体の酵素活性を調べ、元の酵素の活性と同等以上の活性を有する変異体酵素蛋白質を作成する。

9. 段階的に変異する部位の順番が、A 1 、 A 2 、 ・・・ 、 A n の順列組み合わせの種類 (n ! 通り) のうちどれか一つであることを特徴とする請求項 8 に記載の段階的変異による硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

10. 含硫アミノ酸の配列上の位置が A i (i = 1 ~ n) である、n 個の含硫アミノ酸を含む全長 m 個のアミノ酸よりなる酵素蛋白質において、k 個の部位に関しては請求項 7 に記載の方法を行い、残りの n - k 個の部位に関しては請求項 9 に記載の方法を行うことを特徴とする硫黄原子を含まない酵素蛋白質の製造方法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan as Represented by Secretary of Agency of Industrial Science and Technology

<120> Sulphur Free Enzyme

<130> PH-911-PCT

<140>

<141>

<150> JP99/183664

<151> 29-JUN-1999

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 159

<212> PRT

<213> E. coli

<400> 1

Met Ile Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly
1 5 10 15

Met Glu Asn Ala Met Pro Trp Asn Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp
20 25 30

Phe Lys Arg Asn Thr Leu Asn Lys Pro Val Ile Met Gly Arg His
35 40 45

Thr Trp Glu Ser Ile Gly Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile
50 55 60

Ile Leu Ser Ser Gln Pro Gly Thr Asp Asp Arg Val Thr Trp Val
65 70 75

Lys Ser Val Asp Glu Ala Ile Ala Ala Gly Asp Val Pro Glu
80 85 90

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ile Met Val Ile Gly Gly Gly Arg Val Tyr Glu Gln Phe Leu Pro
95 100 105
Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Leu Thr His Ile Asp Ala Glu Val Glu
110 115 120
Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser
125 130 135
Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp Ala Gln Asn Ser His Ser
140 145 150
Tyr Ser Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg
155

<210> 2

<211> 566

<212> DNA

<213> E. coli

<221> CDS

<222> (81)...(557)

<400> 2

ggatccttga caatttagttt actatttgtt ataatgtatt catgagctta actaactaat
ccggaaaagg aggaacttcc atgatcagtc tgattgcggc gctagcggtt gatcgcttta
tcggcatgga aaacgccccatg ccatggaaacc tgcctgccga tctcgccctgg tttaaacgca
acaccttaaa taaacccgtt attatggggc gccatacctt ggaatcaatc ggtaggccctt
tgcccgcccg caaaaatatt atccctcagca gtcaacccgg gaccgatgtt cgggttacct
gggttaatc ggtcgacgaa gccatcgccgg ccgcagggtt cgtaccagaa atcatgggtt
ttggcggccgg acgcgtttat gaacagttct tgccaaaagc gcaaaagctt tatctgacgc
atatcgatgc agaagtggaa ggcgacaccc atttccggta ttacgagccg gatgactggg
aatcggtatt cagcgaatttcc cacgatgtt atgcgcagaa ctgcatacg tattcggttcc
aaatcctcga gctgcgtttaa ggatcc

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 3

<211> 185

<212> PRT

<213> B. subtilis

<400> 3

Ala	Ser	Thr	Asp	Tyr	Trp	Gln	Asn	Trp	Thr	Asp	Gly	Gly	Gly	Ile
1		5							10					15
Val	Asn	Ala	Val	Asn	Gly	Ser	Gly	Gly	Asn	Tyr	Ser	Val	Asn	Trp
	20								25					30
Ser	Asn	Thr	Gly	Asn	Phe	Val	Val	Gly	Lys	Gly	Trp	Thr	Thr	Gly
	35								40					45
Ser	Pro	Phe	Arg	Thr	Ile	Asn	Tyr	Asn	Ala	Gly	Val	Trp	Ala	Pro
	50								55					60
Asn	Gly	Asn	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Tyr	Gly	Trp	Thr	Arg	Ser	Pro
	65								70					75
Leu	Ile	Glu	Tyr	Tyr	Val	Val	Asp	Ser	Trp	Gly	Thr	Tyr	Arg	Pro
	80								85					90
Thr	Gly	Thr	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Lys	Ser	Asp	Gly	Gly	Thr	Tyr
	95								100					105
Asp	Ile	Tyr	Thr	Thr	Arg	Tyr	Asn	Ala	Pro	Ser	Ile	Asp	Gly	
	110								115					120
Asp	Arg	Thr	Thr	Phe	Thr	Gln	Tyr	Trp	Ser	Val	Arg	Gln	Ser	Lys
	125								130					135
Arg	Pro	Thr	Gly	Ser	Asn	Ala	Thr	Ile	Thr	Phe	Ser	Asn	His	Val
	140								145					150
Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	His	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Ser	Asn	Trp	Ala
	155								160					165
Tyr	Gln	Val	Met	Ala	Thr	Glu	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser
	170								175					180

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Asn Val Thr Val Trp

185

〈210〉 4

211 <211> 558

<212> DNA

<213> B. subtilis

<221> CDS

<222> (1)...(555)

<400> 4

gcttagcacag actactggca aaattggact gatggggcgtatagtaaa cgctgtcaat
gggtctggcg ggaattacag tgttaattgg tctaataccg gaaattttgt ttttgtaa
ggttggacta caggttgcatttaggacg ataaactata atgcccggagt ttggcgcccg
aatggcaatg gatatttaac ttatataatgttggacgagat cacctctcat agaatattat
gtatggatt catgggttac ttatagacct actggaacgt ataaaggtac tgtaaaaagt
gatggggta catatgacat atatacaact acacgttata acgcaccitc cattgtatggc
gatcgcaactttaacgca gtactggagt gttcgccagt cgaagagacc aaccggaaagc
aacgctacaa tcactttcag caatcatgtg aacgcatgga agagccatgg aatgaatctg
ggcagtaatt gggcttacca agtcatggcg acagaaggat atcaaagtag tggctcgatcg
aatgttaccgtatggtaa

<210> 5

<211> 159

<212> PRT

<213> E. coli

<400> 5

Ala Ile Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly

1

5

10

15

Asp Glu Asn Ala Leu Pro Trp Asn Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp

THIS PAGE BLANK (USPTO)

20	25	30
Phe Lys Arg Asn Thr Leu Asn Lys Pro Val Ile Tyr Gly Arg His		
35	40	45
Thr Trp Glu Ser Ile Gly Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile		
50	55	60
Ile Leu Ser Ser Gln Pro Gly Thr Asp Asp Arg Val Thr Trp Val		
65	70	75
Lys Ser Val Asp Glu Ala Ile Ala Ala Gly Asp Val Pro Glu		
80	85	90
Ile Phe Val Ile Gly Gly Arg Val Tyr Glu Gln Phe Leu Pro		
95	100	105
Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Leu Thr His Ile Asp Ala Glu Val Glu		
110	115	120
Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser		
125	130	135
Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp Ala Gln Asn Ser His Ser		
140	145	150
Tyr Ser Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg		
155		

<210> 6

<211> 569

<212> DNA

<213> E. coli

<221> CDS

<222> (81)...(560)

<400> 6

ggatccttga caatttagttt actatggttt ataatgtattt catgagctta actaactaat
ccggaaaaagg aggaacttcc atggcaatca gtctgatgc ggcgctagcg gttagatcgcg

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ttatcgcaaa cggaaacgcc ctcccatgga acctgcctgc cgatctcgcc tggtttaaac
 gcaacacctt aaataaaccg gtgatttacg ggcgccatac ctgggaatca atcggttaggc
 ctttgcggccgg ccgcaaaaat attatccctca gcagtcaacc cgggaccgat gatcggtta
 cctgggttaa atcggtcgac gaagccatcg cggccgcagg tgacgtacca gaaatcttcg
 tgattggcgg cggacgcgtt tatgaacagt tcttgccaaa agcgcaaaag ctttatctga
 cgcataatcga tgcagaagtg gaaggcgaca cccatttcc ggattacgag ccggatgact
 gggaaatcggt attcagcgaa ttccacgatg ctgatgcgca gaactcgcat agctattcgt
 tcgaaatcct cgagcgtcgt taaggatcc

<210> 7

<211> 353

<212> PRT

<213>

<400> 7

Ala	Ile	Ser	Leu	Ile	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Asp	Arg	Val	Ile	Gly
1									10				15	
Asn	Glu	Asn	Ala	Leu	Pro	Trp	Asn	Leu	Pro	Ala	Asp	Leu	Ala	Trp
									25				30	
Phe	Lys	Arg	Asn	Thr	Leu	Asn	Lys	Pro	Val	Ile	Tyr	Gly	Arg	His
									40				45	
Thr	Trp	Glu	Ser	Ile	Gly	Arg	Pro	Leu	Pro	Gly	Arg	Lys	Asn	Ile
									55				60	
Ile	Leu	Ser	Ser	Gln	Pro	Gly	Thr	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Trp	Val
									70				75	
Lys	Ser	Val	Asp	Glu	Ala	Ile	Ala	Ala	Gly	Asp	Val	Pro	Glu	
									85				90	
Ile	Phe	Val	Ile	Gly	Gly	Gly	Arg	Val	Tyr	Glu	Gln	Phe	Leu	Pro
									95				100	
Lys	Ala	Gln	Lys	Leu	Tyr	Leu	Thr	His	Ile	Asp	Ala	Glu	Val	Glu

THIS PAGE BLANK (USPTO)

110	115	120
Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser		
125	130	135
Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp Ala Gln Asn Ser His Ser		
140	145	150
Tyr Ser Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg Gly Gly Gly Ser Gly		
155	160	165
Gly Gly Gly Ala Ser Thr Asp Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly		
170	175	180
Gly Gly Ile Val Asn Ala Val Asn Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser		
185	190	195
Val Asn Trp Ser Asn Thr Gly Asn Phe Val Val Gly Lys Gly Trp		
200	205	210
Thr Thr Gly Ser Pro Phe Arg Thr Ile Asn Tyr Asn Ala Gly Val		
215	220	225
Trp Ala Pro Asn Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr		
230	235	240
Arg Ser Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp Ser Trp Gly Thr		
245	250	255
Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Lys Ser Asp Gly		
260	265	270
Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser		
275	280	285
Ile Asp Gly Asp Arg Thr Thr Phe Thr Gln Tyr Trp Ser Val Arg		
290	295	300
Gln Ser Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile Thr Phe Ser		
305	310	315
Asn His Val Asn Ala Trp Lys Ser His Gly Met Asn Leu Gly Ser		
320	325	330

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Asn Trp Ala Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser

335

340

345

Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp

350

<210> 8

<211> 1153

<212> DNA

<213>

<400> 8

ggatccttga caatttagtta actatttgtt ataatgtatt catgagctta actaactaat
ccggaaaaagg aggaacttcc atggcaatca gtctgattgc ggcgcctagcg gtagatcgcg
ttatcgccaa cgaaaaacgcc ctcccatgga acctgcctgc cgatctcgcc tggtttaaac
gcaacacctt aaataaaccg gtgatttacg ggcgcctacatc ctgggaatca atcggttaggc
cttgcggcgg ccgcaaaaat attatcctca gcagtcaacc cgggaccgat gatcggttta
cctgggttaa atcggtcgac gaagccatcg cggccgcagg tgacgtacca gaaatcttcg
tgattggcgg cggacgcgtt tatgaacagt tcttgccaaa agcgcaaaag ctatctga
cgcatatcga tgcagaagtg gaaggcgaca cccatttcc ggattacgag ccggatgact
ggaaatcggt attcagcgaa ttccacgatg ctgatgcgca gaactcgcat agctatcg
tcgaaatcct cgagcgtcgtt ggtggcggtt gctcggtgg tggcggcgct agcacagact
actggcaaaa ttggactgtt gggggcggtt tagtaaacgc tgtcaatggg tctggcgaaa
attacagtgt taattggctt aataccggaa attttgttgt tggtaaaggt tggactacag
gttcgcccatt taggacgata aactataatg ccggagtttgc ggcgcctaat ggcaatggat
atttacttt atatgggtgg acgagatcac ctctcataga atattatgtt gttggattcat
gggtactta tagacctact ggaacgtata aaggtactgt aaaaagtgtt ggggtacat
atgacatata tacaactaca cgtataacg caccttccat tggatggcgat cgcactactt
ttacgcagta ctggagtttgc cggcagtcga agagaccaac cggaaagcaac gctacaatca
ctttcagcaa tcatgtgaac gcatggaaga gccatggaat gaatctggc agtaatttggg
cttaccaagt catggcgaca gaaggatatc aaagtagtgg ctgcgtcaat gttaccgtat

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ggtaaggatc ccc

<210> 9

<211> 353

<212> PRT

<213>

<400> 9

Ala Ile Ser Leu Ile Ala Ala Leu Ala Val Asp Arg Val Ile Gly
1 5 10 15
Asn Glu Asn Ala Leu Pro Trp Asn Leu Pro Ala Asp Leu Ala Trp
20 25 30
Phe Lys Arg Asn Thr Leu Asn Lys Pro Val Ile Tyr Gly Arg His
35 40 45
Thr Trp Glu Ser Ile Gly Arg Pro Leu Pro Gly Arg Lys Asn Ile
50 55 60
Ile Leu Ser Ser Gln Pro Gly Thr Asp Asp Arg Val Thr Trp Val
65 70 75
Lys Ser Val Asp Glu Ala Ile Ala Ala Ala Gly Asp Val Pro Glu
80 85 90
Ile Phe Val Ile Gly Gly Arg Val Tyr Glu Gln Phe Leu Pro
95 100 105
Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Leu Thr His Ile Asp Ala Glu Val Glu
110 115 120
Gly Asp Thr His Phe Pro Asp Tyr Glu Pro Asp Asp Trp Glu Ser
125 130 135
Val Phe Ser Glu Phe His Asp Ala Asp Ala Gln Asn Ser His Ser
140 145 150
Tyr Ser Phe Glu Ile Leu Glu Arg Arg Gly Gly Gly Ser Gly
155 160 165

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Gly Gly Gly Ala Ser Thr Asp Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly
170 175 180
Gly Gly Ile Val Asn Ala Val Asn Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser
185 190 195
Val Asn Trp Ser Asn Thr Gly Asn Phe Val Val Gly Lys Gly Trp
200 205 210
Thr Thr Gly Ser Pro Phe Arg Thr Ile Asn Tyr Asn Ala Gly Val
215 220 225
Trp Ala Pro Asn Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr
230 235 240
Arg Ser Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp Ser Trp Gly Thr
245 250 255
Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Lys Ser Asp Gly
260 265 270
Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser
275 280 285
Ile Asp Gly Asp Arg Thr Thr Phe Thr Gln Tyr Trp Ser Val Arg
290 295 300
Gln Ser Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile Thr Phe Ser
305 310 315
Asn His Val Asn Ala Trp Lys Ser His Gly Leu Asn Leu Gly Ser
320 325 330
Asn Trp Ala Tyr Gln Val Ile Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser
335 340 345
Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp
350

<210> 10

<211> 1153

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> DNA

<213>

<400>10

ggatccttga caatttagtta actatttgtt ataatgtatt catgagctta actaactaat
ccggaaaaagg aggaacttcc atggcaatca gtctgattgc ggcgctagcg gtagatcgcg
ttatcgccaa cgaaaacgcc ctcccatgga acctgcctgc cgatctcgcc tggtttaaac
gcaacacctt aaataaaccg gtgatttacg ggcgccatac ctgggaatca atcggttaggc
cttgcggcgg ccgcaaaaat attatccica gcagtcaacc cgggaccgat gatcggttta
cctgggttaa atcggtcgac gaagccatcg cggccgcagg tgacgtacca gaaatcttcg
tgattggcgg cggacgcgtt tatgaacagt tcttgcctaa agcgcaaaag ctttatctga
cgcatatcga tgcagaagtg gaaggcgaca cccatttcc ggattacgag cggatgact
ggaaatcggt attcagcgaa ttccacgatg ctgatgcgca gaactcgcat agctattcgt
tcgaaatcct cgagcgtcgt ggtggcggtg gctcgggtgg tggcggcgct agcacagact
actggcaaaa ttggactgtat gggggcggtta tagtaaacgc tgcataatggg tctggcggga
attacagtgt taattggct aataccggaa attttgttgt tggtaaaggt tggactacag
tttcgcatt taggacgata aactataatg ccggagtttggcgcgaat ggcaatggat
atttaaatcctt atatggttgg acgagatcac ctctcataga atattatgtt gttggattcat
gggttactta tagacctaact ggaacgtata aaggtactgt aaaaagtgtat ggggtacat
atgacatata tacaactaca cgtataacg caccttccat tgcgtggcgat cgcactactt
ttacgcagta ctggagtgtt cgccagtcga agagaccaac cggaaagcaac gctacaatca
ctttcagccaa tcatgtgaac gcatggaaga gccatggact caatctggc agtaattggg
cttaccaagt catcgcgaca gaaggatatac aaagttagtgg ctcgtcgaat gttaccgtat
ggtaaggatc ccc

THIS PAGE BLANK (USPTO)

37
*Translation
10/019409*
PATENT COOPERATION TREATY**PCT**
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH-911-PCT	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/02112	International filing date (day/month/year) 31 March 2000 (31.03.00)	Priority date (day/month/year) 29 June 1999 (29.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/00, 9/02, 9/24, 15/52, 15/53, 15/56		
Applicant JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:
I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II <input type="checkbox"/> Priority
III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 22 December 2000 (22.12.00)	Date of completion of this report 04 September 2001 (04.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02112

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19

, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/02112

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: EP, 200280, A (Cetus Corp.), 10 December 1986
(10.12.86) & AU, 8652451, A & JP, 61-224985,
A

Document 2: EP, 677584, A1 (Eniricerche Spa), 18 October
1995 (18.10.95) & JP, 8-84584, A & US,
5869298, A

Claims 1-10

Document 1 discloses a biologically active recombinant protein resistant to oxidation, wherein methionine residues susceptible to peroxide oxidation are replaced by other amino acids; and Document 2 discloses replacement of cysteine residues by other amino acids with the objective of eliminating instability without altering enzyme activity.

Therefore, from the disclosures in Document 1 and Document 2 a person skilled in the art could easily deduce the replacement of methionine and cysteine as sources of instability in an enzyme protein by other amino acids. The replacement processes are also within the competence of a person skilled in the art applying known techniques.

Therefore, the inventions set forth in these claims do not involve an inventive step in the light of Documents 1 and 2.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/02112

VI. Certain documents cited**1. Certain published documents (Rule 70.10)**

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
EP,926240,A2	30 June 1999 (30.06.1999)	23 November 1998 (23.11.1998)	03 December 1997 (03.12.1997)
[EX]			

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特許協力条約

E P

U S

P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[P C T 18条、P C T規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 PH-911-P C T	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 00 / 02112	国際出願日 (日.月.年) 31. 03. 00	優先日 (日.月.年) 29. 06. 99
出願人(氏名又は名称) 工業技術院長が代表する日本国		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(P C T 18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものを承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は 出願人が提出したものを承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(P C T 規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N9/00, C12N9/02, C12N9/24, C12N15/52, C12N15/53, C12N15/56

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1' C12N9/00, C12N9/02, C12N9/24, C12N15/52, C12N15/53, C12N15/56

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), 特許ファイル(PATOLIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	EP, 926240, A2 (DEGUSSA AG) 30. 6月. 1999 (30. 06. 99) &DE, 19753350, A1 &CA, 2253021, A1 &JP, 11-225784, A	1-10
Y	EP, 200280, A (CETUS CORP) 10. 12月. 1986 (10. 12. 86) &AU, 8652451, A &DE, 3687763, G &JP, 61-224985, A	1-10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 06. 00

国際調査報告の発送日

04.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4B 9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	EP, 677584, A1 (ENIRICERCHE SPA) 18. 10月. 1995 (18. 10. 95) &DE, 69500108, E &ES, 2096494, T &IT, 1269321, B &JP, 8-84584, A &US, 5807710, A &US, 5869298, A	1-10
Y	WO, 95/12667, A1 (BOEHRINGER MANNHEIM CORP) 11. 5月. 1995 (11. 05. 95) &US, 5492813, A &JP, 9-504695, A &EP, 736091, A1	1-10
A	CHEN, P-F. et al. "Cysteine 184 of endothelial nitric oxide synthase is involved in heme coordination and catalytic activity", J. Biol. Chem. (1994) 第269巻, 第40号 p. 25062-25066	1-10
A	MAGNUS, J. H. et al. "Glycosaminoglycans in extracts of cardiac amyloid fibrils from familial amyloid cardiomyopathy of danish origin related to variant transthyretin Met III", Scand. J. Immunol. (1991) 第34巻, 第1号 p. 63-69	1-10
A	YOSHIMOTO, T. et al, "Pyroglutamyl peptidase gene from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> :cloning, sequencing, expression, and crystallization of the expressed enzyme", J. Biochem. (1993) 第113巻, 第1号 p. 67-73	1-10
A	EP, 275202, A (CHIRON CORP) 20. 7月. 1988 (20. 07. 88) & JP, 63-273473, A &CA, 1289092, C &DE, 3880511, G &ES, 2054792, T	1-10
A	EP, 292763, A (HOECHST AG) 30. 11月. 1988 (30. 11. 88) &DE, 3716722, A &AU, 8816379, A &JP, 63-304987, A &ZA, 8803517, A &DK, 8802715, A &PT, 87501, A	1-10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

47

特許協力条約

PCT

REC'D 21 SEP 2001

PO

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 PH-911-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPOO/02112	国際出願日 (日.月.年) 31.03.00	優先日 (日.月.年) 29.06.99
国際特許分類 (IPC) Int. C17 C12N9/00, 9/02, 9/24, 15/52, 15/53, 15/56		
出願人（氏名又は名称） 工業技術院長が代表する日本国		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対しても訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I 国際予備審査報告の基礎
- II 優先権
- III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV 発明の單一性の欠如
- V PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ある種の引用文献
- VII 国際出願の不備
- VIII 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 22.12.00	国際予備審査報告を作成した日 04.09.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 小暮 道明 印  4B 9838
電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
明細書 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
図面 第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
 PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

この国際出願に含まれる書面による配列表
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

明細書 第 _____ ページ
 請求の範囲 第 _____ 項
 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条 (PCT35条(2)) に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-10 有
請求の範囲 _____ 無

進歩性 (I S)

請求の範囲 _____ 有
請求の範囲 1-10 無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1-10 有
請求の範囲 _____ 無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : EP, 200280, A (CETUS CORP) 10.12月. 1986 (10.12.86)
&AU, 8652451, A &JP, 61-224985, A

文献2 : EP, 677584, A1 (ENIRICERCHE SPA) 18.10月. 1995 (18.10.95)
&JP, 8-84584, A &US, 5807710, A &US, 5869298, A

請求の範囲 1-10

文献1には、過酸化物酸化に感受性のメチオニン残基を他のアミノ酸に置き換えた生物学的活性を有する酸化耐性組換えタンパク質、文献2には、酵素の活性を変えずに不安定性を解消する目的でシステイン残基を異なるアミノ酸で置換すること、が記載されている。

そうすると、文献1及び2の記載をもとに、酵素蛋白質において不安定性の原因となるメチオニンやシステインを他のアミノ酸で置換することは当業者が容易に想到し得るものであると認められる。そして、置換の方法についても当業者が周知技術を適用して適宜なし得たことである。

したがって、上記請求の範囲に記載された発明は引用文献1及び2により進歩性を有さない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
--------------	------------------	------------------	------------------------------

EP, 926240, A2 「EX」	30. 06. 99	23. 11. 98	03. 12. 97
------------------------	------------	------------	------------

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. C17 C12N9/00, C12N9/02, C12N9/24, C12N15/52, C12N15/53, C12N15/56

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. C17 C12N9/00, C12N9/02, C12N9/24, C12N15/52, C12N15/53, C12N15/56

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), 特許ファイル(PATOLIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	EP, 926240, A2 (DEGUSSA AG) 30. 6月. 1999 (30. 06. 99) &DE, 19753350, A1 &CA, 2253021, A1 &JP, 11-225784, A	1-10
Y	EP, 200280, A (CETUS CORP) 10. 12月. 1986 (10. 12. 86) &AU, 8652451, A &DE, 3687763, G &JP, 61-224985, A	1-10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 06. 00

国際調査報告の発送日

04.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4B 9735

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	EP, 677584, A1 (ENIRICERCHE SPA) 18. 10月. 1995 (18. 10. 95) &DE, 69500108, E &ES, 2096494, T &IT, 1269321, B &JP, 8-84584, A &US, 5807710, A &US, 5869298, A	1-10
Y	WO, 95/12667, A1 (BOEHRINGER MANNHEIM CORP) 11. 5月. 1995 (11. 05. 95) &US, 5492813, A &JP, 9-504695, A &EP, 736091, A1	1-10
A	CHEN, P-F. et al. "Cysteine 184 of endothelial nitric oxide synthase is involved in heme coordination and catalytic activity", J. Biol. Chem. (1994) 第269巻, 第40号 p. 25062-25066	1-10
A	MAGNUS, J. H. et al. "Glycosaminoglycans in extracts of cardiac amyloid fibrils from familial amyloid cardiomyopathy of danish origin related to variant transthyretin Met III", Scand. J. Immunol. (1991) 第34巻, 第1号 p. 63-69	1-10
A	YOSHIMOTO, T. et al, "Pyroglutamyl peptidase gene from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> :cloning, sequencing, expression, and crystallization of the expressed enzyme", J. Biochem. (1993) 第113巻, 第1号 p. 67-73	1-10
A	EP, 275202, A (CHIRON CORP) 20. 7月. 1988 (20. 07. 88) & JP, 63-273473, A &CA, 1289092, C &DE, 3880511, G &ES, 2054792, T	1-10
A	EP, 292763, A (HOECHST AG) 30. 11月. 1988 (30. 11. 88) &DE, 3716722, A &AU, 8816379, A &JP, 63-304987, A &ZA, 8803517, A &DK, 8802715, A &PT, 87501, A	1-10